



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

RELEVÂNCIA DA APLICAÇÃO DOS BIOMARCADORES SALIVARES NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CANCRO ORAL

Trabalho submetido por
Adriana Carvalho Póvoas
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

RELEVÂNCIA DA APLICAÇÃO DOS BIOMARCADORES SALIVARES NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DO CANCRO ORAL

Trabalho submetido por
Adriana Carvalho Póvoas
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita

setembro de 2017

Agradecimentos

À minha orientadora, a Professora Doutora Maria Fernanda de Mesquita, agradeço por todo a ajuda empenho, profissionalismo e disponibilidade demonstradas ao longo da elaboração deste trabalho.

Aos meus pais pela oportunidade que me proporcionaram, sem eles este percurso não tinha sido possível.

À minha irmã que me apoiou desde o primeiro dia ao longo destes cinco anos.

Um especial agradecimento à minha colega de box, Vanessa Talhadas, pela sua atitude sempre positiva, pelo seu companheirismo e amizade que estiveram sempre presentes.

A todos os meus amigos, aos que já conhecia e aos que conheci, que tornaram fizeram com que estes cinco anos se tornassem inesquecíveis e cheios de histórias para contar.

A todos os que de alguma forma se cruzaram comigo ao longo deste percurso e fizeram com que fosse possível a realização deste trabalho, muito obrigada.

Resumo

A doença oncológica é a segunda causa de morte em Portugal e o diagnóstico de novos casos de cancro oral, ao longo dos anos, tem tido um crescimento exponencial e por este motivo é considerado um problema de saúde público. O cancro oral está fortemente associado a elevadas taxas de mortalidade, essencialmente, por ser feito um diagnóstico tardio e isto acontece porque em estadios muito iniciais as lesões cancerígenas passam despercebidas no exame clínico. Desta forma, torna-se essencial o estudo de novos métodos de diagnóstico que sejam altamente específicos para esta doença permitindo uma deteção precoce das lesões iniciais de cancro oral. Atualmente, a saliva é um fluido biológico de interesse e os seus componentes tem sido considerados potenciais marcadores de diagnóstico precoce desta doença. Foi realizada uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos recorrendo ao motor de busca Medline/Pubmed tendo a presente revisão o objetivo de perceber qual a relevância da aplicação dos marcadores salivares no diagnóstico precoce do cancro oral e as suas limitações.

Palavras chave: Cancro oral, Diagnóstico salivar, Marcadores salivares, Saliva

Índice Geral

1. Introdução	11
2. Desenvolvimento	17
2.1. A saliva como fluido de diagnóstico e fonte de biomarcadores	17
2.2. Biomarcador	19
2.2.1 Definição de Biomarcador.....	19
2.2.2. Classificação dos Biomarcadores	19
2.2.3 Biomarcador de Diagnóstico	20
2.2.4 Biomarcador de Prognóstico	20
2.2.5 Biomarcador Preditivo ou de Estratificação	20
2.2.6. Características de um Biomarcador Ideal.....	21
2.2.7. Aplicações dos Biomarcadores.....	21
2.3. Biomarcadores Salivares no Diagnóstico do Cancro Oral	22
2.3.1. Proteínas Salivares como Biomarcadores	23
2.3.1.1 Defensinas	23
2.3.1.2 Citoquinas.....	24
2.3.1.3. CD44.....	27
2.3.1.4. Citoqueratina 19	29
2.3.1.5. Lactato Desidrogenase.....	30
2.3.2. DNA como Biomarcador.....	31
2.3.2.1. Mutações somáticas no gene supressor de tumor p53.....	32
2.3.2.2. Hipermetilação dos genes supressores de tumor p16, MGMT DAP-K ..	34

2.3.2.3. Mutações no DNA mitocondrial	36
2.3.2.4. Amplificação do gene ciclina D1	37
2.3.2.5. Diminuição dos níveis de 8-DNA oxiguanina, Maspín, Src	38
2.3.3. RNA como Biomarcador	40
3. Conclusão	47
4. Bibliografia.....	49

Índice de Figuras

Figura 1- Pirâmide da população portuguesa em 2015 e previsão para 2030 e 2060. ... 13

Figura 2 - Previsão da incidência de cancro oral em Portugal desde 2015 até 2035.
(Adaptado de Miranda et al., 2016)..... 14

Índice de Tabelas

Tabela 1- Estimativa de novos casos de cancro oral e morte, por sexo, nos Estados Unidos no ano de 2017. (Adaptado de American Cance Society, 2017).....	13
Tabela 2- Tabela representativa dos marcadores presentes na saliva. (Adaptado de Saxena, Sankhla, Sundaragiri & Bhargava, 2017)	15
Tabela 3- dos biomarcadores. (Adaptado de Radhika et al., 2016)	20
Tabela 4- Resultado dos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos três marcadores propostos para estudo. (Adaptado de Shpitzer et al., 2009).....	39
Tabela 5- Resultado dos parâmetros de sensibilidade e especificidade das sete moléculas de RNA porpostas para o estudo. (Adaptado de Li et al., 2004)	41
Tabela 6- Resumo das alterações dos marcadores salivares nos diferentes estudos efetuados. (Adaptado de Stuaní et al., 2016).....	45

Lista de Siglas

CD44 – molécula de adesão celular

COX 1- ciclooxigenase 1

COX 2 - ciclooxigenase 2

DAP-K - proteína quinase associada à morte celular

DNA – ácido desoxirribonucleico

DUSP1 - dual specificity phosphate I

H3F3A - histona h3 da família 3 A

IL-1 beta – interleucina 1 beta

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

IL-8 – interleucina 8

IL-10 – interleucina 10

IL-13 – interleucina 13

LDH – lactato desidrogenase

LDH-5 – lactato desidrogenase 5

MGMT - O-6-methylguanine-DNA methyltransferaseprovided

OAZI - -Ornithine descarboxylase antizyme 1

RNA – ácido ribonucleico

SAT - spermidine/ spermine N1-acetyltransferase

S100 – S 100 calcium binding protein P

1. Introdução

O estudo dos fluídos corporais surgiu com os curandeiros antigos, acerca de dois mil anos, pois estes acreditavam que a viscosidade, o cheiro e o sabor da saliva traduziam sintomas de diversas patologias. (Yoshizawa et al., 2013) Vários anos mais tarde, em 1990, Mandel afirmou que “a saliva carece do drama do sangue, da sinceridade do suor e do apelo emocional das lágrimas”. Até esta altura, a falta de tecnologia e de conhecimento dos constituintes salivares eram os principais entraves ao uso da saliva como meio de diagnóstico, apesar de toda a comunidade científica reconhecer o potencial deste fluído no diagnóstico e monitorização de diversas doenças. (Castagnola et al., 2011; Malamud & Chavez, 2011)

Em 1960, surgiram as primeiras investigações científicas que usaram a saliva como ferramenta auxiliar no diagnóstico, contudo a falta de protocolos uniformizados levou a resultados pouco credíveis aos olhos dos cientistas. (Lee & Wong, 2009) Em 1975, foi estabelecido um padrão de referência e uma metodologia efetiva para a análise dos compostos salivares permitindo a interpretação em quantidade e qualidade destes e possibilitando o diagnóstico e a escolha da terapêutica adequada para diversas doenças sistêmicas. Desde aí, vários estudos demonstram que a saliva auxilia no diagnóstico de doenças auto-imunes como o Síndrome de Sjogrens, virais como a cárie dentária e hereditárias como a fibrose cística. (Castagnola et al., 2011; Lee & Wong, 2009; Malamud & Chavez, 2011; Malathi, Mythili & Vasanthi, 2014; Yoshizawa et al., 2013) Além destas é também uma ferramenta útil para diagnosticar doenças infecciosas e sistêmicas como a cardiovascular, respiratória, renal e psicossomática. (Castagnola et al., 2011) Tem sido também demonstrado por vários estudos o papel que o biofluído salivar e os seus constituintes desempenham no diagnóstico e monitorização de doenças neoplásicas malignas como o cancro oral. (Miller et al., 2010)

Sabe-se que é possível a identificação de várias alterações celulares e moleculares associadas ao desenvolvimento inicial de lesões cancerígenas como por exemplo, alterações ao nível dos oncogénos, genes supressores de tumor e algumas proteínas. (Jithesh et al., 2013; Markopoulos, Michailidou & Tzimagiorgis, 2010) Com o avanço tecnológico foi possível a identificação destas alterações no biofluído salivar e desta forma a análise da saliva e dos seus constituintes poderá ser útil na descoberta de marcadores de DNA, RNA e

proteicos específicos para o diagnóstico precoce de lesões de cancro oral. (Castagnola et al., 2011)

De uma forma geral, o cancro é definido como “um crescimento considerado anormal e descontrolado das células formando, na maior parte dos casos, uma massa que designamos como tumor.” (Fallis, 2013) As células cancerígenas vão-se multiplicando e vão substituindo às células normais e esta capacidade de divisão autónoma por parte das células é a principal característica da célula neoplásica. (Maley et al., 2017)

No que diz respeito ao cancro oral, a classificação internacional de doenças designa-o como o conjunto de neoplasias malignas que afetam qualquer região da cavidade oral como garganta, lábios, faringe e amígdalas. (Markopoulos et al., 2010; Radhika, Jeddy, Nithya & Muthumeenakshi, 2016) A doença oncológica oral tem vindo a aumentar exponencialmente ao longo dos anos e atualmente constitui um problema de saúde pública. (American Cancer Society, 2017; Azul, Bulhosa, Melo & Trancoso, 2014; Miranda et al., 2016) O tipo de cancro oral mais comum, 90-95% de todos os casos de cancro oral, é o carcinoma oral de células escamosas. (Bano, David & Indira, 2015; Markopoulos et al., 2010; Michailidou et al., 2016; Prasad & McCullough, 2013) Este tipo surge preferencialmente no pavimento da boca, vermelhão do lábio inferior, mucosa jugal, pavimento e dorso da língua, logo no exame intra-oral devemos dar especial atenção a lesões com coloração branca e sem etiologia conhecida, lesões crónicas que não cicatrizam e lesões com grande aumento de volume num espaço de tempo reduzido. (Azul et al., 2014)

A *American Cancer Society* estima que só nos Estados Unidos ocorram 1.688.780 novos casos de cancro no ano de 2017 e prevê que aproximadamente 600.920 destes casos resultem em morte. (American Cancer Society, 2017) Sabe-se que o cancro oral é o sexto mais prevalente em todo o mundo e que constitui 2% a 3% de todos os cancros apresentando um carácter bastante invasivo e agressivo quando diagnosticado tardiamente. (Aziz et al., 2015; Bano et al., 2015; Prasad, Sharma & Babu, 2013) A incidência relativa ao género varia de acordo com o tipo de cancro e relativamente ao cancro oral e da orofaringe, sabe-se que afeta maioritariamente os homens numa proporção de 2:1, a partir da quarta década. (Azul et al., 2014)

	Número estimado de novos casos			Número estimado de mortes		
	Ambos os sexos	Masculino	Feminino	Ambos os sexos	Masculino	Feminino
Cavidade oral e da orofaringe	49,670	35.720	13,950	9,700	7,000	2,7000
Língua	16,400	11,880	4,520	2,400	1,670	730
Boca	13,210	7,800	5,410	2,580	1,680	900
Faringe	17,000	13,780	3,220	3,050	2,340	710
Outros locais da cavidade oral	3,060	2,260	800	1,670	1,310	360

Tabela 1- Estimativa de novos casos de cancro oral e morte, por sexo, nos Estados Unidos no ano de 2017. (Adaptado de American Cance Society, 2017)

Em Portugal, o cancro é considerado a segunda causa de morte no nosso país sendo precedido apenas pela doença cardiovascular e associa-se a elevados níveis de morbilidade e mortalidade. De facto, prevê-se um aumento significativo da incidência desta doença em todas as faixas etárias principalmente nas camadas mais jovens da população. (Miranda et al., 2016) A elevada incidência desta doença está diretamente relacionada com o facto de a esperança média de vida ser cada vez maior como está representado na figura 1 e 2. Estima-se ainda que depois do diagnóstico a taxa de sobrevivência a cinco anos seja de apenas 50%. (Azul et al., 2014)

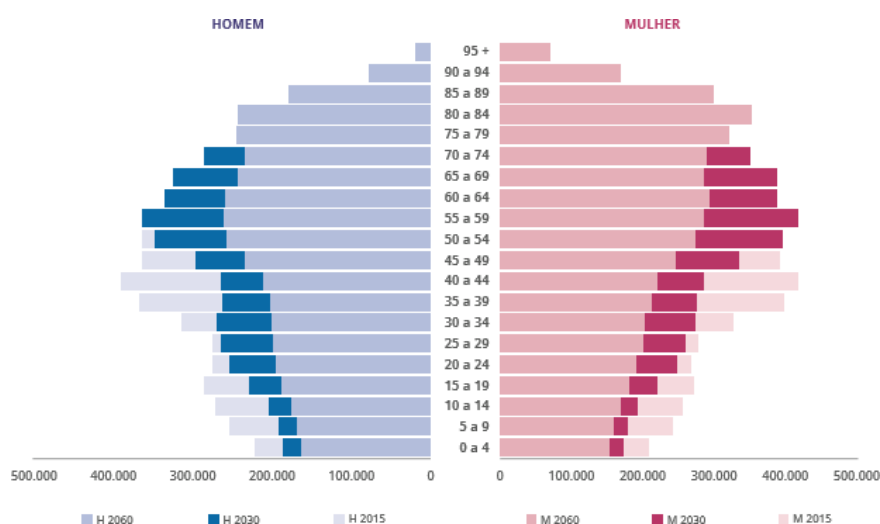


Figura 1- Pirâmide da população portuguesa em 2015 e previsão para 2030 e 2060.

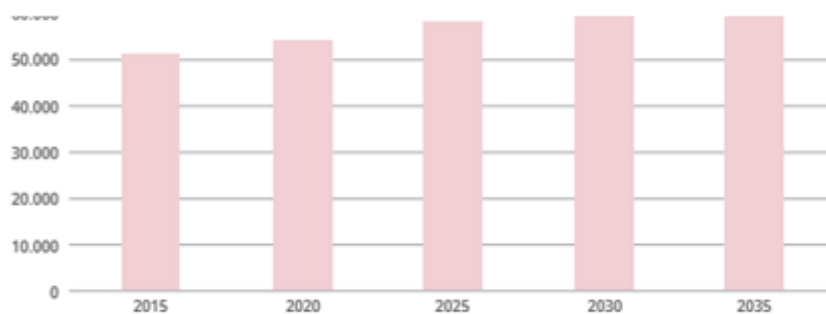


Figura 2 - Previsão da incidência de cancro oral em Portugal desde 2015 até 2035. (Adaptado de Miranda et al., 2016)

Estima-se que depois do diagnóstico a taxa de sobrevivência a cinco anos seja de apenas 50%. O número de novos casos por ano continua a aumentar tendo por base o facto de o diagnóstico não ser feito atempadamente. (Elashoff et al., 2012; Yakob, Fuentes, Wang, Abemayor & Wong, 2014) Tendo em conta os números relativos à incidência e prevalência do cancro oral, apresentados anteriormente, é essencial o estudo de novos métodos e ferramentas de diagnóstico de lesões iniciais de cancro oral como é o caso dos biomarcadores salivares. (Bano et al., 2015)

Os marcadores tumorais são um indicador único para cada doença e por definição são substâncias passíveis de serem medidas e avaliadas, nos fluidos corporais, e que estão presentes em processos patológicos, biológicos compatíveis com saúde e na resposta a uma terapêutica efetuada. (Radhika et al., 2016) Para uma melhor compreensão da função e funcionamento destes marcadores é necessário compreender que do ponto de vista molecular ocorrem inúmeras alterações nas células e nos seus componentes durante o desenvolvimento de lesões de cancro oral. (Bhatt, Mathur, Farooque, Verma & Dwarakanath, 2010)

Numa primeira fase ocorrem mudanças no DNA celular que conduzem a transcrições alteradas de RNA e, consequentemente, alterações na quantidade de proteínas que são expressas no meio intracelular, extracelular e na superfície da célula. (Markopoulos et al., 2010; Prasad et al., 2013; Radhika et al., 2016) Segundo a literatura sabe-se que é possível extrair, em quantidades clinicamente relevantes, DNA, RNA e proteínas da saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas o que faz com que estes constituintes salivares apresentem uma elevada sensibilidade e especificidade para o cancro oral pelo contacto direto com as mucosas, células e produtos resultantes dos processos celulares. (Anaya, 2013) Como a sua concentração está alterada quando

comparamos amostras salivares de pacientes com cancro com os grupos controlo constituídos por indivíduos saudáveis podemos afirmar que estes componentes são potenciais biomarcadores salivares. (Bano et al., 2015)

Neste trabalho iremos abordar a relevância da aplicação de três tipos de marcadores salivares no diagnóstico precoce do cancro oral. Os marcadores de DNA, RNA e proteicos, são atualmente, os mais relevantes e estudados no cancro oral e estão evidenciados na tabela que se segue.

Marcador salivar de DNA	Marcador salivar de RNA	Marcador salivar proteico
Mutação somática no gene p53	IL-8	Níveis elevados de defensina-1
Perda de heterozigotia nos cromossomas 3p, 9q, 13q, 17p	IL-1beta	Níveis elevados de CD44
Hipermetilação do promotor dos genes p16, MGMT, DAP-K	H3F3A	Níveis elevados de IL-8
Diminuição dos níveis de 8-DNA-oxiguanina, Maspin, Src	S100p	Cyfra 21-1
	DUSP1	LDH
	OAZ1	
	SAT	

Tabela 2- Tabela representativa dos marcadores presentes na saliva. (Adaptado de Saxena, Sankhla, Sundaragiri & Bhargava, 2017)

2. Desenvolvimento

2.1. A saliva como fluido de diagnóstico e fonte de biomarcadores

A saliva é uma secreção exócrina muco-serosa, transparente e ligeiramente ácida por apresentar um pH compreendido entre 6 e 7. É um fluido heterogêneo e aquoso constituído por 99.4%-99.5% de água e 0.5% de matéria sólida sendo que destes, 0.3% são matéria orgânica e 0.2% matéria inorgânica. A heterogeneidade da saliva total prende-se pelo facto de ser uma mistura complexa de secreções, das glândulas salivares, cavidade nasal e faringe, fluido crevicular, bactérias da flora oral, restos de descamações epiteliais, células sanguíneas e resíduos provenientes da alimentação ou mediação feita pelo indivíduo. (Castagnola et al., 2011)

Diversos estudos indicam que o fluido salivar, o fluido crevicular e o biofilme são ferramentas úteis no diagnóstico de várias doenças sistémicas entre elas, o cancro oral. (Prasad et al., 2013) No entanto, o diagnóstico salivar ainda é pouco utilizado entre os especialistas, e por isso o diagnóstico de patologias sistémicas é feito, essencialmente, através da associação de três fatores que são os sintomas reportados pelo paciente, o exame clínico realizado pelo profissional de saúde e o exame laboratorial no qual se utiliza, maioritariamente, uma amostra de sangue ou de urina. (Malamud & Chavez, 2011) Por outro lado, o interesse em utilizar o biofluido salivar no diagnóstico de doenças não só orais mas também sistémicas tem vindo a aumentar ao longo do tempo porque a literatura descreve que a informação obtida numa amostra de saliva é muito idêntica aquela que se obtém recolhendo uma amostra de sangue. Isto acontece porque existe uma permuta constante de moléculas entre o plasma sanguíneo e as células acinares devido à elevada permeabilidade que caracteriza as glândulas salivares. (Yoshizawa et al., 2013)

Diversos autores afirmam “que os marcadores tumorais presentes na saliva derivam do soro plasmático ou são produzidos localmente.” (Bano et al., 2015; Markopoulos et al., 2010; Prasad et al., 2013) No que diz respeito aos marcadores derivados do soro plasmático, como o sistema de capilares envolve as glândulas os autores sugerem as vias transcelular – transporte ativo e difusão passiva - e paracelular – ultrafiltração - como forma de as células sanguíneas chegarem à cavidade oral alterando a constituição da saliva. (Markopoulos et al., 2010) Por outro lado, quando os autores consideram que os marcadores são produzidos localmente, consideram que são mecanismos como lise, apoptose e necrose celular que

estão na origem da sua produção. (Bano et al., 2015) No entanto, o mecanismo exato que possibilita a presença de marcadores tumorais no fluído salivar ainda não está totalmente estudado. (Prasad et al., 2013)

Num artigo de revisão, publicado por Wang, Wang, Tu e Wong (2016) e seus colaboradores compararam a recolha de uma amostra salivar com a recolha de uma amostra de sangue e concluíram que:

- A recolha de uma amostra de saliva é efetivamente mais simples e não requer um técnico especializado;
- É um método não invasivo que não confere nenhum tipo de desconforto e por isso a realização de *follow up* periodicamente é bem aceite pelo paciente, principalmente na faixa etária pediátrica e geriátrica que se apresentam como as menos cooperantes;
- É mais fácil de armazenar porque ao contrário do sangue não coagula;
- É mais seguro para o técnico uma vez que o risco de contaminação por qualquer tipo de doença é reduzido quando tratamos uma amostra de saliva.

No entanto, segundo Santos, Iglesias, Souza, Freitas e Galvão (2007) o uso de uma amostra salivar também apresenta desvantagens uma vez que o fluxo e a composição salivar são alterados por fatores como:

- Ritmo circadiano;
- Sexo;
- Idade;
- Dieta;
- Abuso de medicamentos;
- Quimioterapia;
- Radioterapia;
- Estado emocional;
- Gravidez.

2.2. Biomarcador

Atualmente, associando o constante avanço dos meios tecnológicos ao conhecimento da doença oncológica notamos que existem diversas técnicas que nos permitem identificar de forma relativamente rápida um grupo de biomarcadores específicos para uma determinada doença. A identificação de um marcador tumoral tem por base a biologia do tumor e o agente farmacológico utilizado para o seu tratamento. (Radhika et al, 2016)

2.2.1 Definição de Biomarcador

O Instituto Nacional do Cancro definiu biomarcador como sendo uma molécula biológica passível de ser encontrada no sangue e noutros fluídos corporais, nos produtos resultantes do metabolismo e nos tecidos. Completou ainda esta definição acrescentado que estas moléculas são sinais com a capacidade de distinguir processos compatíveis com saúde ou doença. (Agrawal, Gupta, Bey, Tewari, Yadav & Gard 2015)

Mais tarde, um biomarcador foi definido como um processo, estrutura ou substância passível de ser quantificada e avaliada objetivamente no organismo, ou nos produtos derivados do seu metabolismo, com a capacidade de identificar uma determinada patologia, monitorizar o estado de saúde do indivíduo e reconhecer a resposta do organismo a uma intervenção terapêutica. (Bano et al., 2015) Conclui-se que estas moléculas fazem a distinção entre indivíduos com a doença e indivíduos sem a doença. (Henry & Hayes, 2012)

2.2.2. Classificação dos Biomarcadores

Os biomarcadores classificam-se de acordo com as biomoléculas e com o estadio da doença. Assim, se nos basearmos nas biomoléculas temos DNA, RNA e proteínas como biomarcadores. Por outro lado, tendo em conta o estadio da doença iremos ter biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e preditivos (Radhika et al., 2016)

2.2.3 Biomarcador de Diagnóstico

Este tipo de marcador assume como função a identificação e a deteção de um determinado tipo de cancro num individuo ou população e para este efeito deve possuir elevada especificidade e sensibilidade para o tipo de tumor que se quer diagnosticar. A sensibilidade é definida pela capacidade que o marcador tem de identificar indivíduos com a doença que se pretende estudar. Ao contrário desta, a especificidade é a capacidade que o marcador tem de identificar indivíduos verdadeiramente normais. (Kulasingam & Diamandis, 2008)

Classificação dos biomarcadores			
Biomoléculas	DNA	RNA	Proteína
Estadio da doença	Diagnóstico	Prognóstico	Preditivo

Tabela 3- dos biomarcadores. (Adaptado de Radhika et al., 2016)

2.2.4 Biomarcador de Prognóstico

Um marcador de prognóstico dá-nos uma previsão do curso da doença e da possibilidade de vir a existir recorrência ou não da mesma. Desta forma, o profissional de saúde só recorre a este tipo de marcador depois de estar estabelecido o estadio da doença uma vez que estes também terão um papel fundamental na escolha da terapia utilizada. (Kulansigam & Diamandis, 2008)

2.2.5 Biomarcador Preditivo ou de Estratificação

Com este tipo de marcador conseguimos identificar quais são os indivíduos que respondem ou não à terapia que lhes será implementada, isto porque tem a capacidade, através do tipo de células tumorais do indivíduo, de prever a resposta a determinados tipos de fármacos antes de se dar início ao tratamento. (Kulansigam & Diamandis, 2008)

2.2.6. Caraterísticas de um Biomarcador Ideal

Existem diversos requisitos que devem ser tidos em conta no momento em que escolhemos um biomarcador. Em seguida serão apresentadas as características de um biomarcador ideal descritas por Agrawal e seus colaboradores em 2015:

- Deve ser produzido pelas células tumorais;
- Produto estável e fácil de quantificar nos fluídos corporais como o sangue e urina;
- Deve estar presente em concentrações diminuídas no plasma sanguíneo dos indivíduos saudáveis;
- Elevada sensibilidade e especificidade para o tumor que se pretende estudar;
- Deve alterar de acordo com as alterações decorridas na lesão cancerígenas;
- Deve ter a capacidade de prever a ocorrência de recidivas ainda antes de estas serem clinicamente visíveis

2.2.7. Aplicações dos Biomarcadores

Os biomarcadores têm inúmeras aplicações, que auxiliam de forma vantajosa os profissionais de saúde, no diagnóstico atempado e escolha da terapêutica adequada na doença oncológica. Seguidamente, serão descritas as diversas aplicações dos biomarcadores segundo Bhatt e seus colaboradores (2010):

- Avaliação do risco de o indivíduo vir a desenvolver uma determinada doença – através desta estimativa é possível alterar comportamentos de risco e avaliar a necessidade de se realizar cirurgia profilática ou terapia preventiva.
- Diagnóstico diferencial – os indivíduos que se encontrem em fase de diagnóstico poderá recorrer-se ao uso de biomarcadores para exclusão de determinadas patologias.

- Detecção precoce – no que diz respeito ao cancro oral, se esta já estiver instalado, os biomarcadores poderão ser úteis de duas formas: na descoberta do tecido de origem da lesão neoplásica e na identificação do estadio em que se encontra o tumor fazendo um prognóstico (independentemente de já ter sido feita terapia ou não).
- Monitorização e seleção da terapia mais adequada – através da utilização dos biomarcadores é possível o profissional de saúde avaliar a eficácia da terapia uma vez que estes marcadores são preditivos para uma terapia mais específica e adequada.
- Avaliação de recorrência da doença – em indivíduos que já tenham completado os ciclos de quimioterapia, o controlo de uma possível recorrência pode ser feito através da utilização de biomarcadores, ainda antes de o individuo se tornar sintomático.
- Avaliação do prognóstico e da ocorrência de metástases – através de alterações nos biomarcadores é possível o profissional de saúde entender as alterações moleculares subjacentes ao processo de carcinogénese e entender de que forma se desenvolve a doença.

2.3. Biomarcadores Salivares no Diagnóstico do Cancro Oral

“O diagnóstico do cancro oral através de marcadores salivares pode ser disposto em três fases.” (Markopoulos, Michailidou, & Tzimagiorgis, 2010) Numa primeira fase ocorrem mudanças no DNA celular que conduzem a transcrições alteradas de RNA e, consequentemente, ocorrem alterações na quantidade de proteínas que são expressas no meio intracelular, extracelular e na superfície da célula. (Bano et al., 2015; Radhika et al., 2016)

2.3.1. Proteínas Salivares como Biomarcadores

Segundo Markopoulos (2010) os marcadores salivares proteicos possibilitam uma correta avaliação do prognóstico e do diagnóstico do cancro oral por apresentarem parâmetros de especificidade e de sensibilidade considerados moderados. O número de marcadores proteicos, expressos na saliva, que sofrem alterações durante o desenvolvimento de lesões pré malignas e malignas de cancro oral é muito elevado. (Khan, Khurshid, Akhbar & Moin, 2016)

2.3.1.1 Defensinas

As defensinas são péptidos catiónicos produzidos pelas células do epitélio da mucosa e que podem ser agrupadas em alfa e beta, sendo as últimas expressas no tecido epitelial na forma de beta defensinas -1,-2 e -3. (Han et al., 2014) No que diz respeito à cavidade oral são produzidas pelos tecidos orais e pelas glândulas salivares sendo possível quantificá-las de forma adequada na saliva e no fluido crevicular. Estas proteínas estão localizadas na membrana das células e são ativadas no combate a vírus, bactérias e fungos.

A defensina-1 apresenta uma concentração mais elevada na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas e por isso, este péptido foi proposto como marcador de diagnóstico para o cancro oral. (Winter et al., 2011) Sabe-se que existe uma correlação positiva entre o aumento da concentração deste péptido na saliva e o desenvolvimento de lesões pré malignas e malignas. (Prasad et al., 2013 & Bano et al., 2015 & Radhika et al., 2016) Mais tarde também foi possível demonstrar a expressão de beta defensina -1 em diferentes fases do processo carcinogénico através da análise de 62 biópsias de tecido oral afetado com leucoplasia e carcinoma oral de células escamosas. Depois de ter sido realizado o *microarray* de todos os tecidos, os autores concluíram que existe menor expressão de beta defensina -1 em lesões pré malignas quando comparadas com lesões malignas. No entanto, como este estudo não foi realizado com amostras de saliva não nos permite avaliar a eficácia da defensina -1 como marcador salivar de diagnóstico no cancro oral. (Han et al., 2014)

2.3.1.2 Citoquinas

As citoquinas, grupo de proteínas com baixo peso molecular, são responsáveis pela regulação de diferentes processos biológicos como crescimento e ativação celular, reparação tecidual e resposta inflamatória, entre outros. (Prasad & McCullough, 2013) Atualmente, o interesse neste tipo de proteínas tem crescido e têm sido realizados vários estudos no sentido de perceber o envolvimento das citoquinas no cancro oral. Associando o papel das citoquinas no processo de carcinogénese e o facto de estas serem passíveis de ser medidas na saliva levou a que tenham sido propostas para marcadores de diagnóstico e prognóstico do cancro oral assumindo que os pacientes portadores de lesões orais malignas e pré malignas apresentam elevados níveis destas proteínas no sangue. (Sahibzada, Khurshid, Khan, Naseem, Siddique & Mali, 2017)

O carcinoma oral de células escamosas é conhecido pela sua etiologia multifatorial e no que diz respeito aos processos de crescimento descontrolado das células e inflamação sabe-se estão na origem do seu desenvolvimento e tanto as células tumorais como as células como as células reguladoras da imunidade são responsáveis pela secreção de citoquinas anti inflamatórias e pró inflamatórias nas células cancerígenas. As citoquinas pró inflamatórias regulam a proliferação e o crescimento das células tumorais ao contrário das anti inflamatórias que regulam de forma negativa a resposta imunológica anti tumoral. (Aziz et al., 2015) Segundo Prasad & McCullough (2013), as citoquinas que mais despertam interesse nos investigadores são:

- Interleucina 4
- Interleucina 6
- Interleucina 8
- Interleucina 10

Na cavidade oral existem diversas condições que potenciam o aumento dos níveis de citocinas como úlceras aftosas, doença periodontal, displasia e lesões de carcinoma oral de células escamosas. (Sahibzada et al., 2017) No entanto, sabe-se que de uma forma geral, perante condições inflamatórias as citocinas induzem processos de cicatrização e reparação tecidual. Isto não acontece quando estamos perante células cancerígenas, na verdade, perante este tipo de células as citocinas diminuem a resposta imune, inibem a reparação tecidual e influenciam de forma negativa os mecanismos de regulação, proliferação e diferenciação celular promovendo o processo de angiogénese que é fundamental para a progressão da malignização. (Bano et al., 2015; Prasad et al., 2013)

Sabe-se que a interleucina-6 está envolvida no processo de desenvolvimento das lesões cancerígenas sendo a sua concentração maior na saliva de indivíduos portadores de lesões orais pré malignas e de cancro oral sugerindo esta proteína como um marcador de diagnóstico para este tipo de cancro. Este facto foi demonstrado num estudo reportado por Prasad & McCulloch (2013) que demonstrou a existência de maior expressão de IL-6 na saliva dos indivíduos diagnosticados com leucoplasia. Mais tarde outro estudo realizado por Selvam e Sadaksharam (2015) onde foram analisadas 75 amostras salivares veio confirmar os resultados obtidos anteriormente. Também este autor obteve maior expressão de interleucina 6 na saliva de indivíduos diagnosticados com leucoplasia. Apesar de estes estudos indicarem a interleucina 6 como um marcador salivar eficaz para a deteção precoce de lesões pré malignas, como a leucoplasia, devemos ter em conta que os indivíduos saudáveis que constituíram o grupo de controlo não foram despistados para a presença de úlceras aftosas e doença periodontal o que pode influenciar de forma negativa os resultados, pois como já foi referido anteriormente, estas condições aumentam por si só os níveis de citocina. (Aziz et al., 2015; Sahibzada et al., 2017)

No mesmo ano, Aziz e seus colaboradores (2015) analisaram a expressão das interleucinas 4, 10 e 13 na saliva de indivíduos diagnosticados com cancro oral em diferentes fases de diferenciação. Ao contrário do que aconteceu num estudo referido anteriormente, realizado por Selvam e Sadaksharam (2015), neste todos os indivíduos portadores de doença periodontal foram excluídos. Os resultados demonstraram que as concentrações mais elevadas pertenceram às interleucinas 10 e 13 e os autores

sugeriram a sua utilização como marcadores de diagnóstico e prognóstico. Os autores referiram também um possível envolvimento das interleucinas 4 e 13 nos processos de invasão e metástase tumoral por se encontrarem expressas em níveis clinicamente significantes nas amostras salivares correspondentes às lesões de cancro oral bem diferenciadas. No que diz respeito à interleucina 10, os autores sugeriram uma associação entre esta proteína e o grau de agressividade do tumor, referindo que a mesma poderá ser utilizada como marcador preditivo, principalmente em estádios pouco avançados, uma vez que foi no grupo com menor grau de diferenciação que a sua concentração foi mais elevada. (Aziz et al., 2015)

Foi realizado outro estudo onde se avaliaram as concentrações salivares de interleucina 6 e 8 e do fator de necrose tumoral alfa, entre outras, em indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas. No final, demonstrou-se, mais uma vez, o aumento concentração de interleucina 6 na saliva dos indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas evidenciando a eficácia desta como marcador salivar de diagnóstico do cancro oral. No entanto, no que diz respeito às concentrações de interleucina 8 e do fator de necrose tumoral alfa, apesar de terem sido mais elevadas no grupo de estudo, os autores consideraram que o aumento não foi significativo e sugeriram que seria necessário a realização de mais investigação com o objetivo de perceber o papel destas duas citocinas no diagnóstico e na avaliação da terapêutica do cancro oral. (Sahibzada et al., 2017)

Ao contrário do que aconteceu neste estudo, foi efetuado um outro, por Punyani e Sathawane (2013) onde foi demonstrado o aumento da expressão de interleucina 8 na saliva de indivíduos diagnosticados com lesões pré malignas e cancro oral. A concentração desta citocina foi bastante mais elevada na amostras salivares recolhidas do grupo de estudo. Com os resultados obtidos neste estudo foi possível sugerir esta citocina como um potencial marcador de diagnóstico do cancro oral. Este estudo também demonstrou o envolvimento desta interleucina nos processos de angiogénese e progressão tumoral pois a sua concentração aumentava de forma proporcional com o aumento do grau de malignização das lesões sugerindo a potencialidade desta proteína como um marcador de prognóstico do cancro oral. (Punyani & Sathawane, 2013) O mesmo aumento da expressão de interleucina 8 foi confirmado num estudo realizado por Kaur e Jacobs (2015), que teve como objetivo calcular e analisar as concentrações

das interleucinas 8 e 6 na saliva e no sangue de indivíduos com diversas condições associadas entre elas, líquen plano que apresenta potencial de malignização, leucoplasia e fibrose submucosa. Ao analisarem os resultados e comparando-os com o grupo de controlo, os autores concluíram que as concentrações, de ambas as interleucinas e do fator de necrose tumoral alfa, estavam aumentadas, na saliva e no sangue, dos indivíduos que faziam parte dos grupos de estudo sugerindo as mesmas como potenciais marcadores salivares de diagnóstico do cancro oral. Os resultados ainda demonstraram uma associação positiva entre o estadio das lesões e o aumento das concentrações de interleucina 6 e 8, isto é, a concentração dos marcadores foi tanto maior quanto mais avançado era o estadio da lesão mostrando a eficácia dos mesmos como marcadores salivares de prognóstico do cancro oral.

No entanto, apesar dos resultados obtidos todos os autores referenciados anteriormente sugerem a realização de um protocolo que uniformize a elaboração dos estudos com o objetivo de dar mais credibilidade aos mesmos. (Kaur et al., 2015; Punyani et al., 2013; Sahibzada et al., 2017)

2.3.1.3. CD44

As moléculas de adesão, localizadas na membrana celular, funcionam essencialmente como recetores que ao emitirem sinais possibilitam a comunicação entre o meio extracelular e intracelular. Os processos de sinalização são essenciais para que as células desempenhem funções de regeneração e reparação tecidual e de resposta inflamatória e imunológica. Desta forma, em condições normais estas moléculas assumem funções de supressão tumoral mas aquando do desenvolvimento de lesões cancerígenas estas sofrem alterações que potenciam os processos de invasão e metástase das células neoplásicas. É reconhecido o envolvimento do recetor CD44, que é um recetor de hialuronato, no processo de desenvolvimento de lesões malignas.

O gene CD44 codifica diferentes proteínas isoformicas que estão muito associadas ao processo de malignização. No entanto, o papel deste varia de acordo com o tipo de cancro uma vez que ele assume funções de supressão tumoral em cancros da próstata

mas no que diz respeito ao cancro oral sabe-se que está associado a neoplasias agressivas. (Azevedo & Sunkel, 2012; Franzmann et al., 2014)

Sabe-se que a concentração de CD44 está aumentada na saliva de indivíduos diagnosticados com cancro oral, tendo isto em conta e sendo, passível de ser quantificada na saliva, foi proposta como marcador salivar de diagnóstico do cancro oral. Esta faz parte de diversos processos que ocorrem ao nível celular tais como: crescimento celular, invasão, migração adesão e sinalização e a sua expressão está aumentada em indivíduos portadores de lesões malignas, doenças autoimunes e inflamações crónicas. (Basakran, 2015; Ravindran, 2012; Senbanjo & Chellaiah, 2017) Além destes, a sua intervenção no processo de carcinogénese tem sido amplamente estudado ao longo do tempo. Sabe-se que mesmo em indivíduos saudáveis, o risco de vir a desenvolver cancro oral é tanto maior quanto maior for a concentração desta glicoproteína no organismo. (Athanasios-Papaeftymiou et al., 2008; Franzmann et al., 2012) Com o objetivo de avaliar a relevância desta proteína no desenvolvimento de lesões cancerígenas efetuou-se um estudo onde analisou 102 amostras salivares de indivíduos diagnosticados com cancro da cabeça e pescoço. Estas foram comparadas com amostras salivares de indivíduos portadores de inflamação crónica, condição que aumenta a concentração desta proteína no sangue e na saliva, para testar a sensibilidade e especificidade da proteína na deteção do cancro oral. Os resultados apresentaram valores variáveis de sensibilidade na ordem dos 62%-70% e uma especificidade também variável entre 75%-88% tendo ficado demonstrada capacidade deste marcador em distinguir lesões cancerígenas de lesões benignas. (Franzmann et al., 2012)

Mais tarde foi realizado um estudo onde se comparou 2 tipos de amostra de epitélio oral recolhidas de indivíduos diagnosticados com papiloma oral de células escamosas, uma variante muito rara e agressiva do carcinoma oral de células escamosas, e de indivíduos diagnosticados com papiloma dos ductos salivares que foram posteriormente comparadas com amostras de epitélio normal. Ao contrário do que seria expectável foi nas amostras de epitélio dos indivíduos com papiloma oral de células escamosas que a expressão da glicoproteína CD44 foi menor podendo existir uma perda de expressão associada à malignidade e por isso a um pior prognóstico. Com base nos resultados obtidos, os ambos autores sugeriram esta proteína como um marcador salivar de diagnóstico do cancro oral mas também evidenciaram a necessidade da realização de

mais estudos com o objetivo de apurar a causa das discrepâncias nos resultados. (Fitzpatrick, Montague, Cohen, & Bhattacharyya, 2013)

2.3.1.4. Citoqueratina 19

Esta proteína faz parte da constituição do citoesqueleto e a sua clivagem pela caspase-3 faz com que seja libertado um fragmento solúvel designado por Cyfra 21-1 que se sabe estar presente, em maior quantidade, nos tecidos neoplásicos do que nos tecidos normais. Assume um papel relevante no processo de apoptose celular, principalmente na fase intermédia do mesmo. No que diz respeito às lesões neoplásicas orais, sabe-se que, durante a apoptose, quando a expressão da citoqueratina 19 aumenta, aumenta também a expressão de cyfra 21-1. O aumento da expressão desta proteína no meio extracelular é quase sempre acompanhado de um aumento no meio intracelular. (Anaya, 2013) No caso de lesões com suspeita de malignidade, o conhecimento de que existe um aumento da concentração deste fragmento na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas poderá ser uma ferramenta útil no despiste precoce de lesões orais pré malignas e malignas e dada a possibilidade de quantificar esta proteína na saliva a mesma foi proposta como marcador de diagnóstico do cancro oral. (Bano et al., 2015; Ravindran, 2012)

Zhong e seus colaboradores compararam a expressão de cyfra 21-1 na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas e na saliva de indivíduos saudáveis e demonstraram a existência de um aumento, desta proteína na saliva dos indivíduos com carcinoma, associado a valores de sensibilidade e especificidade de 50% e 86,7%, respetivamente. Os autores sugeriram a mesma como um potencial marcador de diagnóstico do cancro oral. Além do potencial de diagnóstico também existe um potencial para a deteção precoce de possíveis recorrências uma vez que a sua concentração é mais elevada na saliva de pacientes com história de recidiva comparando com os que não sofreram recidiva. (Zhong et al., 2007) Nagler e seus colaboradores (2006) realizaram um estudo analisando a saliva de 21 indivíduos portadores de carcinoma oral de células escamosas que já tinham efetuado o tratamento para o cancro e estavam monitorizados à cerca de três anos e meio. Em termos de diferenciação, a maior parte da amostra apresentava um grau moderado e foi

demonstrado um aumento da concentração de cyfra 21-1 de 400% na saliva dos 21 indivíduos. No que diz respeito à sensibilidade e especificidade os resultados foram 71% e 75%, respetivamente e perante isto, os autores sugeriram então esta proteína como um potencial biomarcador para o diagnóstico precoce do cancro oral. (Nagler, Bahar, Shpitzer, Feinmesser, 2006)

2.3.1.5. Lactato Desidrogenase

A lactato desidrogenase caracteriza-se por ser uma enzima oxiredutora presente em quase todas as células e sabe-se que o piruvato é reduzido a lactato através de uma reação de carácter reversível catalisada por esta enzima, num meio anaeróbio. Esta enzima está intimamente relacionada com morte celular e lesões tecidulares e das cinco isoenzimas identificadas, sabe-se que duas são predominantes no fluído salivar - lactato desidrogenase 4 e lactato desidrogenase 5. (Anaya, 2013) Uma das características visíveis no desenvolvimento do cancro é a desregulação da energia presente nas células. De facto, as células cancerígenas optam pela via da glicólise em vez de utilizarem o oxigénio disponível para assegurar uma proliferação bastante rápida. A sobreutilização da via glicolítica faz aumentar a atividade da enzima lactato desidrogenase e consequentemente ocorre uma acumulação de ácido láctico que possibilita o crescimento das células tumorais a um ritmo bastante mais acelerado quando comparado com a velocidade de crescimento das células normais. Esta adaptação metabólica foi identificada como um sinal de alarme para o desenvolvimento de lesões cancerígenas. (Saluja, Spadigam, Dhupar, Syed, 2015) Como é possível quantificar esta enzima no fluído salivar e como foi demonstrada uma atividade aumentada da lactato desidrogenase na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas, esta enzima foi proposta como marcador salivar de diagnóstico do cancro oral. (Markopoulos et al., 2010)

Foi realizado um estudo por Shpitzer e seus colaboradores (2009) com o objetivo de avaliar a relevância da lactato desidrogenase nos processos de proliferação e morte celular, metastase e carcinogénese. Foi demonstrado um aumento da expressão desta enzima na saliva de pacientes portadores de cancro da língua associado a percentagens de sensibilidade e especificidade consideradas clinicamente relevantes pelos autores,

79% e 42%, respetivamente. Tendo em conta os resultados, os autores consideraram a lactato desidrogenase um marcador fiável no diagnóstico do cancro oral. (Shpitzer et al., 2009)

Mais tarde, realizou-se outro estudo por Saluja e seus colaboradores (2015) que demonstrou elevada atividade da enzima lactato desidrogenase em 71,43% das amostras salivares analisadas. Os mesmos autores, também avaliaram a expressão e eficácia da isoenzima lactato desidrogenase 5 na deteção do cancro oral e de facto os resultados também mostraram uma expressão aumentada desta na saliva dos indivíduos portadores de carcinoma oral de células escamosas. Portanto, quando aumenta a expressão de lactato desidrogenase aumenta também a expressão da sua isoenzima. Contudo, este estudo também demonstrou valores normais de actividade de lactato desidrogenase em 21,78% das amostras salivares de indivíduos portadores de carcinoma. No entanto, os autores explicaram estes valores afirmando que os níveis salivares de lactato desidrogenase de cada indivíduo eram desconhecidos antes de o tumor de se começar a desenvolver. (Saluja et al., 2015) Apesar dos resultados, a amostra utilizada no estudo foi bastante reduzida e por isso devemos ter algum cuidado na extrapulação destes resultados para a nossa prática clínica até porque existem muitas condições associadas à cavidade oral – doença periodontal e trauma - que aumentam a atividade da enzima lactato desidrogenase e que não foram incluídas nos critérios de exclusão da amostra podendo influenciar os resultados. (Anaya, 2013)

2.3.2. DNA como Biomarcador

A ocorrência de inúmeras alterações genéticas específicas desencadeia duas fases do processo de desenvolvimento de lesões malignas que são a iniciação e a progressão. (Saxena et al., 2017) Pensa-se que estas alterações genéticas tenham um efeito cumulativo nas células ao longo do tempo e que afetem três classes de genes: oncogénos, genes supressores de tumor e genes reparadores de DNA. Portanto, com estes tipos de gene afetados as células tornam-se resistentes aos mecanismos naturais de morte celular, ocorrendo uma desregulação da proliferação celular e consequentemente uma expressão do genótipo cancerígeno. (Bhatt et al., 2010) Segundo Prasad e seus colaboradores (2013) os marcadores de DNA são universais e altamente específicos

sendo detetados em estadios muito precoces do desenvolvimento de lesões malignas é imperativo que o DNA seja considerado um potencial marcador de diagnóstico deste tipo de lesões. (Bano et al., 2015; Radhika et al., 2016) É importante realçar que a avaliação precisa de biomarcadores, em amostras de saliva, depende de fatores como a natureza bioquímica do marcador e a forma como estes chegam até à cavidade oral e a amostra de DNA pode ser recolhida em vários fluídos biológicos, entre eles, a saliva e por isso, os investigadores sugerem a recolha de DNA através da saliva como um método relativamente simples e tendo isso em conta, atualmente, diversas alterações no DNA das células cancerígenas estão a ser estudadas como possíveis marcadores salivares para o diagnóstico precoce do cancro oral (Bano et al., 2015; Markopoulos et al., 2010; Radhika et al., 2016) entre elas:

- Mutações somáticas no gene supressor de tumor p53
- Amplificação do gene ciclina D1
- Mutações no DNA mitocondrial
- Hipermetilação do promotor dos genes p16, MGM5, DAP-K
- Diminuição dos níveis de 8-DNA oxiguanina, Maspin, Src fosforilada

2.3.2.1. Mutações somáticas no gene supressor de tumor p53

O conceito de gene supressor de tumor tornou-se válido na comunidade científica em meados do ano 1986 através da realização de uma experiência *in vitro* onde foi possível observar que a injeção, de um gene supressor numa célula tumoral, tinha a capacidade de reverter o crescimento descontrolado da mesma. Os genes supressores de tumor apresentam a capacidade de regular e manter a homeostasia celular mas a perda da sua função está diretamente relacionada com o risco aumentado ou indução de malignização. A mutação é um dos mecanismos mais relevantes quando se fala em inativação dos genes supressores de tumor e estas alterações fazem com que exista uma menor capacidade de reparação do DNA, por parte dos genes reparadores, levando à ocorrência de instabilidade genética e consequentemente à perda da homeostasia celular. (Azevedo & Sunkel, 2012)

No entanto, a perda de heterozigotia também é um mecanismo muito frequente de silenciamento dos genes supressores de tumor. Esta perda de heterozigotia, numa determinada região de um par de cromossomas tem potencial para ser um marcador preditivo para lesões com características pré malignas e malignas. Os estudos realizados nesta área demonstraram a existência de uma relação positiva entre a perda de material genético nos cromossomas 3p, 9q, 13q e 17p e o início do processo de carcinogénese. Além disto também foi demonstrada uma associação positiva entre a perda de heterozigotia nos cromossomas 3p e 9q e o risco aumentado de transformação maligna. (Prasad et al., 2013) No entanto, não é possível considerar esta alteração como um marcador salivar porque os estudos realizados utilizaram biópsias da cavidade oral na amostra. Associado ao diagnóstico salivar do cancro oral foi proposto como marcadores salivar a mutação somática no gene p53 (Markopoulos et al., 2010)

O gene p53 é um supressor tumoral produzido em resposta a vários tipos de danos que ocorram no DNA das células. Na verdade, aquando da ocorrência de uma mutação este tem a capacidade de interromper o ciclo celular, como resposta ao dano causado no material genético, e por isso é bastante relevante no controlo do mesmo e no processo de apoptose celular. (Azevedo & Sunkel, 2012) Um defeito neste gene que culmine na inibição da sua atividade é uma das principais causas para o desenvolvimento de lesões cancerígenas e por isso, quase 50% de todos os indivíduos diagnosticados com diversos tipos de cancro, entre eles o cancro oral, apresentam mutações ao nível do p53.

De uma forma geral este gene previne a multiplicação descontrolada de células anormais induzindo processos de reparação do DNA. (Anaya, 2013) Em sujeitos diagnosticados com cancro oral existe uma acumulação do p53 na sua forma inativa que leva, posteriormente, à produção de anticorpos contra a mesma. Este facto foi confirmado por Warnakulasuriya, Soussi, Maher, Johnson e Tavassoli (2000) num estudo onde foi possível quantificar os anticorpos de p53 na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas. A quantidade de material genético que conseguimos extrair, da saliva de indivíduos diagnosticados com cancro oral, é clinicamente relevante e como as mutações no gene p53, são passíveis de ser detetadas e quantificadas nessas mesmas amostras de saliva, foram propostas como marcadores de diagnóstico do cancro oral. (Malamud & Chavez, 2011) Os estudos realizados foram comparativos, ou seja, a análise dos resultados foi feita através de uma

comparação entre um grupo de estudo, constituído por indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas, e um grupo de controlo constituído por indivíduos saudáveis. Em todos os estudos realizados foi demonstrada e quantificada a expressão de mutações no gene p53 na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas. (Saxena et al., 2017)

Boyle e seus colaboradores (1993) analisaram 102 amostras de saliva e identificou mutações no gene p53 em 71% destas. Os mesmos autores também concluíram que a incidência de mutações no gene p53 era significativamente mais elevada nos indivíduos que apresentavam lesões com carácter invasivo do que nos diagnosticados com lesões não invasivas, 43% e 19%, respetivamente. Desta forma, os autores concluíram que as mutações ocorriam antes do processo de invasão, que é uma característica das células neoplásicas que lhe permite penetrar nos tecidos vizinhos circundantes sem perder a continuidade anatómica. Tendo em conta este facto, os autores sugeriram o gene p53 como um potencial marcador de prognóstico do cancro oral.

No entanto, apesar de também terem sido encontradas 18,52% de mutações ao nível deste gene na saliva de indivíduos saudáveis, os autores sugeriram as mutações no gene p53 como marcadores muito específicos para a identificação de células tumorais e diagnóstico do cancro oral.

2.3.2.2. Hipermetilação dos genes supressores de tumor p16, MGMT DAP-K

O gene p16 é um supressor tumoral que codifica uma proteína com a capacidade de inibir o ciclo celular em circunstâncias onde a integridade das células está comprometida desempenhando um papel bastante importante no processo de carcinogénese. Este pode ser silenciado de diferentes formas nas lesões de neoplasia entre elas: mutação, deleção homozigótica e no caso do cancro oral este gene pode ser silenciado através de hipermetilação do seu promotor. (Azevedo, 2012) Sabe-se que a perda de heterozigotia do gene p16 está associada ao início do desenvolvimento de lesões malignas. (Buajeeb, Poomsawat, Punyasingh & Sanguansin, 2009) Tal como o gene p16 também as proteínas MGMT e DAP-K tem a capacidade de regular o ciclo

celular, sendo que a MGMT atua na defesa das células contra agentes mutagénicos e carcinogénicos e a hipermetilação do seu gene promotor está associada a vários tipos de cancro como o cancro oral, linfoma e cancro do pulmão. No que diz respeito à proteína DAP-K é uma proteína quinase associada à morte celular e regulada pelo stress inerente a vários processos celulares. Esta proteína também intervém em processos de sinalização celular e de resposta auto-imune. (Jayaprakash, Radhakrishnan, Ray & Satyamoothy, 2017; Liggett & Sidransky, 1988; Lin, Hupp & Stevens, 2010)

Tal como a mutação que foi descrita anteriormente, também a hipermetilação do promotor pode silenciar os genes supressores tumorais levando a uma perda no controlo do crescimento das células que afeta a regulação positiva e negativa do ciclo celular. (Azevedo & Sunkel, 2012) No que diz respeito ao cancro oral foram propostos como biomarcadores salivares de diagnóstico a hipermetilação do promotor do genes p16, MGMT e DAP-K. (Radhika et al., 2016) Num estudo realizado por Rosas e seus colaboradores (2001), foi possível observar a hipermetilação do promotor destes genes em todos os estadios tumorais e foi notória uma expressão aumentada dos mesmos nos tumores da cavidade oral. O estudo demonstrou a expressão de hipermetilação do promotor do gene p16, MGMT e DAP-K em 47%, 33% e 23%, das amostras salivares de indivíduos diagnosticados com cancro da cabeça e pescoço, respetivamente.

Mais tarde, Don e seus colaboradores (2014) afirmaram que a hipermetilação do promotor dos genes p16, MGMT e DAP-K estava presente em 43%, 39,8% e 39,7% das amostras de saliva recolhidas de indivíduos portadores de carcinoma oral de células escamosas. A presença, na saliva, de hipermetilação nos promotores dos genes descritos anteriormente deve ser considerada um marcador salivar de diagnóstico e monitorização do cancro oral. (Don et al., 2014) Foi realizado outro estudo numa população que pretendeu avaliar o impacto da metilação no promotor do gene MGMT no carcinoma oral de células escamosas e foi demonstrada a existência de uma relação positiva entre a metilação do gene promotor de MGMT e o carcinoma. Neste estudo, os autores consideraram a metilação do promotor do gene MGMT um marcador preditivo para o cancro oral, mas é de realçar que a amostra analisada não foi a saliva e portanto é necessário ter alguma atenção na extrapolação de resultados. Ou seja, a metilação deste gene pode ser considerada pelos autores um marcador molecular mas não podemos considerar que seja um marcador salivar. (Jayaprakash et al., 2017) De uma forma geral

os estudos mostram a existência de evidência científica para que se considere a hipermetilação do DNA em lesões pré malignas de cancro oral e concluíram que deve ser considerada um potencial biomarcador salivar de diagnóstico do cancro oral. No entanto, alguns autores afirmam que a validação dos estudos pode estar comprometida pelo facto de as amostras utilizadas serem reduzidas e pelo facto de os critérios de seleção dos grupos de controlo não serem bem definidos. (Don et al., 2014; Rosas et al., 2001)

2.3.2.3. Mutações no DNA mitocondrial

As mitocôndrias estão presentes na maior parte das células eucariotas e caracterizam-se por possuírem um genoma próprio que lhes permite a capacidade de efetuar a síntese proteica. No entanto, pensa-se que é o DNA nuclear que codifica a maior parte das proteínas mitocondriais que são, posteriormente, importadas para estes organelos. É importante que exista uma simbiose perfeita entre o DNA mitocondrial e o DNA nuclear para que as mitocôndrias exerçam da melhor forma as suas funções. As mitocôndrias encarregam-se de fazer chegar às células a energia que estas precisam mas além desta função também participam em alguns processos inflamatórios, de sinalização celular e de morte celular programada. (Azevedo, 2012) É conhecido e aceite pela comunidade científica que várias doenças têm por base alterações estruturais e funcionais das mitocôndrias que levam a uma expressão anormal de proteínas que, posteriormente, se irá traduzir numa doença mitocondrial. (Fliss et al., 2000) Desta forma, é evidente a relação existente defeitos nos genes mitocondriais e o aparecimento de algumas doenças, entre elas o cancro oral. Como é possível isolar o DNA mitocondrial a partir de uma amostra de saliva a mutação no DNA mitocondrial foi proposta como marcador salivar de diagnóstico para o cancro oral. Desde aí que tem sido estudado por diversos autores a existência de uma associação entre mutações no DNA mitocondrial e o desenvolvimento do carcinoma oral de células escamosas. (Prasad et al., 2013)

A presença de mutações no DNA mitocondrial foi avaliada nos fluídos corporais de indivíduos diagnosticados com diferentes tipos de cancro: bexiga, cabeça e pescoço e pulmão. Foi na saliva que se encontrou uma maior percentagem de mutações somáticas – 46%. O facto de se ter encontrado uma percentagem significativa no cancro da cabeça

e pescoço, levou os investigadores a pensar que neste tipo de cancro os danos ao nível do DNA mitocondrial são cumulativos ao longo do tempo. (Fliss et al., 2000) No que diz respeito ao cancro da cabeça e pescoço sabe-se que a mutação que mais se destaca ocorre na região D-loop e diversos autores afirmam que existe 67% de mutações somáticas na saliva de indivíduos diagnosticados com cancro da cabeça e pescoço. (Prasad et al., 2013)

Foram propostos a estudo dois genes específicos do DNA mitocondrial – Cox 1 e 2 com o objetivo de se perceber se o aumento deste na saliva estaria ou não associado ao aparecimento de carcinoma oral de células escamosas. Foram analisadas 94 amostras salivares de indivíduos diagnosticados com carcinoma em vários estadios – I, II, III e IV e foi demonstrado, com um intervalo de confiança de 95% um aumento de COX 1 e 2 na saliva dos indivíduos diagnosticados com carcinoma. Também foi demonstrada a existência de uma relação positiva entre o aumento do DNA mitocondrial e o grau de transformação maligna uma vez que a expressão dos dois genes propostos para o estudo foi tanto maior quanto mais avançado era o estadio tumoral indicando a mutação no DNA mitocondrial como um marcador de prognóstico eficaz para o cancro oral. (Jiang et al., 2005)

2.3.2.4. Amplificação do gene ciclina D1

As ciclinas são proteínas com uma função muito relevante na regulação do ciclo celular. São conhecidos quatro tipos destas proteínas: G1, G1S, S e M e a sua designação corresponde à fase do ciclo celular que regulam. Isto significa que as diferentes fases do ciclo celular são caracterizadas por ciclinas específicas que precisam de ser degradadas com o objetivo de permitir que a célula entre na fase seguinte levando a que o ciclo celular ocorra unidirecionalmente. Estas proteínas ativam e inibem outras proteínas dentro da célula alvo promovendo um bom funcionamento do ciclo celular. O que acontece com as ciclinas designa-se de amplificação e leva a uma produção anormal e exagerada deste tipo de proteínas pelo facto de o gene que as codifica ser copiado inúmeras vezes. Desta forma, são enviados diversos sinais às células para que se dividam o que faz com que estas se multipliquem e cresçam a uma velocidade maior,

que as células normais, promovendo a ocorrência e progressão de cancro. (Azevedo & Sunkel, 2012)

É conhecida uma relação positiva entre a amplificação do gene de ciclina D1 e o prognóstico reservado e, portanto é previsível que haja um aumento da expressão desta proteína na saliva de indivíduos diagnosticados com cancro oral. (Prasad et al., 2013) Por estas razões os cientistas acharam pertinente propor a ampliação do gene de ciclina D1 como um marcador salivar de diagnóstico e prognóstico do cancro oral. (Radhika et al., 2016) A presença de ciclina D1 foi avaliada, em 62 biópsias de tecido oral afetado por carcinoma oral de células escamosas da laringe e foi demonstrado um ligeiro aumento na expressão de ciclina D1 nos tecidos lesados, mas de facto, os resultados não foram conclusivos quanto à existência de uma relação entre a expressão desta proteína, nos tecidos cancerígenos, e o prognóstico da doença a estudar. No entanto, os resultados obtidos em tecido não podem ser extrapolados para a saliva. (Vielba et al., 2003) Mais tarde, a expressão de ciclina D1 foi quantificada na saliva de 19 indivíduos portadores de cancro da língua, nos estadios T1,T2,T3, T4 e os resultados mostraram parâmetros de sensibilidade e especificidade na ordem dos 100% tendo por isso demonstrado o valor da amplificação de ciclina D1 como marcador de diagnóstico. No entanto, este marcador ainda está pouco estudado e diversos autores afirmam que a fiabilidade dos estudos pode estar comprometida pelo facto de as amostras utilizadas serem reduzidas. (Shpitzer et al., 2009)

2.3.2.5. Diminuição dos níveis de 8-DNA oxiguanina, Maspin, Src

O stress oxidativo de algumas proteínas, tem vindo a ser estudado como um sinal de alarme para o desenvolvimento de lesões cancerígenas, por apresentar um carácter irreversível e irreparável. (Azevedo & Sunkel, 2012) Segundo Shpitzer e seus colaboradores (2009) o fluído salivar de indivíduos portadores de carcinoma oral de células escamosas contém uma quantidade anormal de radicais livres capazes de induzir alterações no epitélio da mucosa. A enzima 8-DNA oxiguanina glicosilada tem a função de reparar danos induzidos por este stress oxidativo, no entanto, na presença de lesões cancerígenas, esta enzima perde a sua capacidade anti-oxidante e desta forma, a

diminuição do seu nível em termos de quantidade e funcionalidade é considerada um risco para o desenvolvimento de lesões cancerígenas, por apresentar um carácter irreversível e irreparável. (Azevedo & Sunkel, 2012)

Segundo Shpitzer e seus colaboradores (2009) o fluído salivar de indivíduos portadores de carcinoma oral de células escamosas contém uma quantidade anormal de radicais livres capazes de induzir alterações no epitélio da mucosa. A enzima 8-DNA oxiguanina glicosilada tem a função de reparar danos induzidos por este stress oxidativo, no entanto, na presença de lesões cancerígenas, esta enzima perde a sua capacidade anti-oxidante e desta forma, a diminuição do seu nível em termos de quantidade e funcionalidade é considerada um risco para o desenvolvimento de diversos tipos de cancro, entre eles, o cancro do pulmão e o cancro oral. (Shpitzer et al., 2006) Sabendo que é possível a sua quantificação no fluído salivar a sua diminuição foi proposta como marcador de diagnóstico do cancro oral. Além desta, a proteína SCR, da família das proteínas quinases, apresenta uma concentração elevada na saliva de indivíduos saudáveis. No entanto, é fosforilada num ambiente stress oxidativo fazendo com que haja um aumento da sua concentração ao mesmo tempo que ocorre uma diminuição da concentração de Src. (Shpitzer et al., 2009) Como assume particular importância em processos de adesão celular, proliferação e metástase também a sua diminuição foi proposta como marcador de diagnóstico do cancro oral. Além destas foi ainda proposta uma proteína de supressão tumoral designada por Maspin que intervém em processos de supressão do crescimento e progressão tumoral, angiogénese, invasão e metástase. (Wongnopavich, Dukaew, Choonate & Chairatvit, 2017)

Num estudo que analisou a saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas, verificou-se uma diminuição na concentração de 8-DNA oxiguanina, Maspin, Src com valores de 16%, 29% e 24%, respetivamente.

Biomarcador	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
8-DNA oxiguanina	77	75
Src fosforilada	77	75
Maspin	100	100

Tabela 4- Resultado dos parâmetros de sensibilidade e especificidade dos três marcadores propostos para estudo. (Adaptado de Shpitzer et al., 2009)

Tendo em conta os resultados apresentados anteriormente é possível estabelecer uma relação positiva entre a diminuição dos níveis de 8-DNA oxiguanina, Maspin, Src e o desenvolvimento de lesões cancerígenas o que levou a sugerir estes três marcadores como potenciais marcadores de diagnóstico do cancro oral. (Shpitzer et al., 2009)

2.3.3. RNA como Biomarcador

A informação genética que está contida no DNA sofre um processo de transcrição originando uma molécula de RNA mensageiro que posteriormente é traduzida numa proteína. As moléculas de RNA assumem um papel preponderante no armazenamento da informação genética e na regulação da sua expressão. Além destas funções são precursores diretos dos elementos proteicos transportando-os para o citoplasma, local onde são traduzidos. (Zimmermann & Wong, 2008) Tendo em conta a complexidade inerente a este processo qualquer alteração no processamento pode levar ao desenvolvimento de certas doenças, como é o caso do cancro oral. (Azevedo & Sunkel, 2012) Ao longo dos anos os cientistas pensaram que o RNA era degradado na saliva mas atualmente sabe-se que isso não acontece e esta molécula começa a ser vista como um marcador credível e informativo para algumas doenças como é o caso do cancro oral. Apesar de o mecanismo ainda não ser totalmente conhecido, porque há um aumento das RNases na saliva de indivíduos diagnosticados com cancro, pensa-se que as moléculas de RNA presentes na saliva não são degradadas por estarem contidas em exosomas ou micro vesículas ou por sofrerem acção protetora de algumas proteínas salivares. (Bano et al., 2015; Michailidou et al., 2016)

Segundo Michailidou e seus colaboradores (2016), por volta do ano 2000 foi confirmada a presença de moléculas de RNA no biofluido salivar e desde essa altura que a investigação se prende com o uso destas moléculas como marcadores salivares de diagnóstico do cancro oral, no entanto, a fonte ideal de recolha de moléculas de RNA salivar é um assunto bastante discutível e no que diz respeito ao cancro oral, Li e seus colaboradores (2004) defendem que o local do tumor é ideal para a recolha destas moléculas. No entanto, segundo Newshean, Aziz, Panayiotidis e Georgakilas (2012) as glândulas salivares, o fluido crevicular e as células da mucosa oral também são fontes credíveis na colheita desta molécula. Tendo em conta, apenas o seu aumento na saliva

de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas, foram propostas como marcadores salivares de diagnóstico e prognóstico do cancro oral sete moléculas de RNA – DUSP1, H3F3A, IL-8, IL1 beta, OAZ1, S100, SAT. (Radhika et al., 2016) Todas as moléculas propostas sofrem alterações aquando do desenvolvimento de lesões cancerígenas e no que diz respeito às suas funções sabe-se que estas são relevantes na regulação da transcrição e tradução com o objetivo de assegurar a estabilidade cromossómica. (Mehta et al., 2010)

Li e seus colaboradores (2004) analisaram 32 amostras salivares de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas tendo sido verificado um aumento, clinicamente significativo e relevante das sete moléculas referidas anteriormente, associado a valores elevados de sensibilidade e especificidade que estão descritos na tabela 6. No entanto, as moléculas de IL1BETA, OAZ1, SAT e IL8 destacaram-se por apresentarem uma expressão mais elevada que as restantes. (Li et al., 2004) Estas quatro moléculas desempenham funções na proliferação e diferenciação celular, angiogénese, resposta inflamatória e na reparação tecidual e as alterações induzidas nas mesmas, aquando do processo de desenvolvimento de lesões cancerígenas, podem ser consideradas uma assinatura molecular no diagnóstico do cancro oral. (Bano et al., 2015) Pela elevada percentagem no parâmetro da sensibilidade, 90,6%, os autores também concluíram que a associação de IL8, SAT e H3F3A funciona como um marcador preditivo para o cancro oral. Neste estudo foi defendida a ideia de que um só marcador não é eficaz no diagnóstico do cancro oral pelo facto de este apresentar uma etiologia multifatorial. (Li et al., 2004)

Marcador	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
DUSP1	59	75
H3F3A	53	81
IL1BETA	63	72
IL8	88	81
OAZI	100	38
S100P	72	63
SAT	81	56

Tabela 5- Resultado dos parâmetros de sensibilidade e especificidade das sete moléculas de RNA propostas para o estudo. (Adaptado de Li et al., 2004)

Mais tarde, foi avaliado o valor de diagnóstico das moléculas IL1BETA, IL8, OAZ e SAT na saliva de indivíduos portadores de carcinoma oral de células escamosas, tendo sido demonstrada a existência de um aumento significativo de todos os marcadores na saliva dos indivíduos que constituíram a amostra de estudo. A IL-8 e SAT, marcadores que apresentaram maior expressão e em termos de sensibilidade e especificidade obtiveram resultados de 81,3% e 73,9%, respectivamente. As concentrações de IL-8 e SAT permanecem praticamente inalteradas na saliva de indivíduos portadores de leucoplasia e displasia sendo por isso pouco eficazes no diagnóstico precoce do câncer oral. (Michailidou et al., 2016)

Tendo em conta que os estudos efetuados tiveram por base a comparação de saliva de indivíduos diagnosticados com lesões pré malignas e malignas com a saliva de indivíduos saudáveis é relevante o conhecimento das alterações que ocorrem ao nível das concentrações dos marcadores.

Referência	Marcador	Resultado do estudo
Nagler et al., 2006	Cyfra 21-1	Aumento de 400% na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas; Sensibilidade – 71%; Especificidade – 75%
Zhong et al., 2007	Cyfra 21-1	Aumento da expressão de cyfra 21-1 na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas associado a valores de sensibilidade e especificidade de 50% e 86,7%, respectivamente
Sahibzada et al., 2017	Cyfra 21-1	Não existiu alteração relevante na concentração de cyfra 21-1 na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas
Franzmann et al., 2014	CD44	Elevada sensibilidade (62%-70%) e especificidade (75%-88%) na distinção de lesões orais cancerígenas e lesões Benignas

Fitzpatrick et al., 2013	CD44	Diminuição da expressão de CD44; Possível associação a um mau prognóstico
Prasad e McCullough.,2013; Selvam e Sadaksharam, 2015	IL-6	Aumento dos níveis de IL-6 na saliva de indivíduos com leucoplasia e cancro oral
Prasad e McCullough, 2013	IL-6	Níveis mais aumentados de IL-6 durante a realização de Quimioterapia
Punyani et al., 2013	IL-8	Nível aumentado de IL-8 na saliva de indivíduos com cancro oral concomitante com o aumento do grau de malignização da lesão
Aziz et al., 2015	IL-4, IL-10, IL-13	Níveis aumentados de IL-4, 10 e 13 na saliva de indivíduos diagnosticados com cancro oral;
Aziz et al., 2015	IL-4, IL-13	Possível envolvimento de IL-4 e IL-13 em processos de metástase e invasão pelos níveis aumentados nas amostras de saliva de lesões bem diferenciadas
Aziz et al., 2015	IL-10	Nível elevado de IL-10 nas amostras de saliva de lesões pouco diferenciadas; Possível associação com a agressividade da lesão
Kaur e Jacobs., 2015	IL-8 e IL-6	Nível de IL-6 e IL-8 aumentado na saliva em consonância com o aumento do grau de malignização da lesão
Sahibzada et al., 2017	IL-6 e IL-8	Nível de IL-6 aumentado na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas; Nível de IL-8 na mesma amostra não teve alterações significativas

Shpitzer et al., 2009	LDH	Aumento da concentração na saliva de indivíduos com cancro da língua; Sensibilidade – 79%; Especificidade – 42%
Saluja et al., 2015	LDH	Elevada atividade da enzima em 71,43% das amostras salivares de carcinoma oral de células escamosas
Saluja et al., 2015	LDH-5	Expressão aumentada de LDH-5 na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas; Expressão normal de LDH-5 em 21,78% das amostras
Boyle et al., 1993	Mutação somática do p53	71% de mutações no p53 na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas
Liao et al., 2000	Mutação somática do p53	62,5% de mutações no p53 na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas
Rosas et al., 2001	Hipermetilação do promotor de p16, MGMT, DAP-K	A hipermetilação foi identificada na saliva nas seguintes percentagens P16 – 47% MGMT – 33% DAP-K – 23%
Markopoulos et al., 2010	Hipermetilação do promotor de p16, MGMT, DAP-K	A hipermetilação foi identificada na saliva nas seguintes percentagens P16 -43% MGMT – 39,8% DAP-K – 39,7%
Makiko et al., 2000	Mutação no DNA mitocondrial	46% de mutações na saliva de indivíduos diagnosticados com cancro da cabeça e pescoço
Jiang et al., 2005	Mutação no DNA mitocondrial	Aumento dos genes COX 1 e 2 na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas em vários estádios

Vielba et al, 2003	Amplificação do gene de ciclina D1	A expressão da ciclina D1 não foi relevante em biópsias de carcinoma de células escamosas da laringe
Shpitzer et al., 2009	Amplificação do gene de ciclina D1	Valores de sensibilidade e especificidade de 100% na saliva de indivíduos portadores de cancro da língua
Shpitzer et al., 2009	Diminuição dos níveis de 8-dna oxiguanina, maspin, src	Diminuição da concentração de todos os marcadores na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma
Li et al, 2004	DUSP1, H3F3A, IL8, IL1-BETA, OAZI, S100, SAT	Aumento da expressão dos sete marcadores na saliva de indivíduos diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas
Michailidou et al.,2016	IL1BETA, IL8, OAZ, SAT	Aumento da expressão de todos os marcadores na saliva de indivíduos com carcinoma oral de células escamosas; Concentrações inalteradas de IL-8 e SAT na saliva de indivíduos com leucoplasia e displasia -

Tabela 6- Resumo das alterações dos marcadores salivares nos diferentes estudos efetuados. (Adaptado de Stuari et al., 2016)

3. Conclusão

O cancro oral é considerado um problema de saúde pública e o número de novos casos tem aumentado exponencialmente ao longo dos anos sendo por isso necessária a sensibilização das populações, nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, no que diz respeito a alterações de hábitos e estilos de vida que aumentem o risco de vir a desenvolver esta doença. O cancro é uma doença bastante complexa e como tal o seu diagnóstico também se torna complexo. A investigação atual está mais focada na prevenção do que no tratamento e tem sido constante o desenvolvimento do ramo da medicina molecular em particular no que respeita ao diagnóstico através da saliva, apesar de a biópsia associada a um exame clínico minucioso ser o gold standart no diagnóstico do cancro oral.

Dada a variedade de processos e genes envolvidos no desenvolvimento do cancro oral pode concluir-se que este diagnóstico não se deve basear num só biomarcador, mas num conjunto destes, dada a etiologia multifatorial desta patologia e os inúmeros genes envolvidos na formação das células cancerígenas. Têm sido realizados inúmeros estudos com o objetivo de mostrar a relevância destes marcadores no diagnóstico de diversas doenças. Atualmente, o uso dos biomarcadores presentes na saliva para o diagnóstico está em constante investigação. No entanto, apesar de os níveis de sensibilidade e especificidade serem bastante elevados o seu uso no diagnóstico do cancro oral não é relevante, porque a existência de uma grande lacuna na elaboração de protocolos que uniformizem a realização de estudos, não permite que os mesmos sejam corretamente validados. Apesar de o diagnóstico salivar ser mais cómodo e acessível para o paciente é de salientar que não existem normas definidas para os especialistas atuarem. Isto quer dizer que os estudos analisados anteriormente não foram todos realizados da mesma forma, facto que pode ter influenciado os resultados. É necessário que se estabeleçam regras para a realização destes estudos que como pode ser comprovado são na sua grande maioria comparativos, comparando apenas indivíduos saudáveis e indivíduos diagnosticados com cancro.

Além disto, ainda não é totalmente conhecido o perfil molecular da saliva dos indivíduos diagnosticados com cancro oral o que faz com que os estudos comparativos

percam alguma credibilidade. Também a seleção quer do grupo de estudo quer do grupo de controlo deveria ser mais criteriosa porque por exemplo, se fizer parte do grupo controlo um individuo portador de periodontite, automaticamente os marcadores do tipo interleucina estarão alterados. Além desta desvantagem, não existe um protocolo para a colheita de saliva, análise e armazenamento como forma de uniformizar os estudos o que pode criar erros no resultado final.

O diagnóstico do cancro oral através da saliva ainda está longe de ser implementado mas poderá vir a ser uma prática comum entre os médicos dentistas que como profissionais de saúde estão na primeira linha para o rastreio e diagnóstico atempado desta doença que pode começar por manifestar-se através de suaves alterações na mucosa oral. Deve ser rotineiro na prática do médico dentista um exame intra-oral minucioso porque as lesões potencialmente malignas ou malignas são assintomáticas numa fase inicial, carecendo muitas vezes de atenção por parte do paciente e profissionais de saúde.

4. Bibliografia

- Agrawal, Neha, Gupta, N, Bey, Afshan, Tewari, R, Yadav, P, Gard, A. (2015). Salivary Biomarkers for Early. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, (January).
- American Cancer Society. (2017). Cancer Facts & Figures, 76. <https://doi.org/10.1101/gad.1593107>
- Anaya. (2013). Biomarcadores de câncer oral en saliva, (1), 293–302. <https://doi.org/10.4321/S0213-12852013000600003>
- Athanassiou-Papaefthymiou, M., Shkeir, O., Kim, D., Divi, V., Matossian, M., Owen, J. H., ... Papagerakis, S. (2008). Evaluation of CD44 variant expression in oral, head and neck squamous cell carcinomas using a triple approach and its clinical significance. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 27(3), 337–49. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>. Use
- Azevedo, Carlos e Sunkel, C. (2012). *Biologia Celular e Molecular*.
- Aziz, S., Ahmed, S. S., Ali, A., Khan, F. A., Zulfiqar, G., Iqbal, J., ... Shoaib, M. (2015). Salivary Immunosuppressive Cytokines IL-10 and IL-13 Are Significantly Elevated in Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Cancer Investigation*, 33(7), 318–328. <https://doi.org/10.3109/07357907.2015.1041642>
- Azul, A. M., Bulhosa, J. F., Melo, P. R. de, & Trancoso, P. F. (2014). *Intervenção Precoce No Cancro Oral - Guia Para Profissionais De Saude. Ordem dos Médicos Dentistas*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Bano, S., David, M. P., & Indira, A. P. (2015). Salivary Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma : An Overview. *IJSS Case Reports and Reviews*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.17354/cr/2015/13>
- Basakran, N. S. (2015). CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Medical Journal*, 36(3), 273–279. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.3.9622>
- Bhatt, A. N., Mathur, R., Farooque, A., Verma, A., & Dwarakanath, B. S. (2010). Cancer biomarkers - current perspectives. *The Indian Journal of Medical Research*, 132(August), 129–149.

- Boyle, J. O., Hakim, J., Koch, W., van der Riet, P., Hruban, R. H., Roa, R. A., ... Sidransky, D. (1993). The Incidence of p53 Mutations Increases with Progression of Head and Neck Cancer. *Cancer Research*, 53(19), 4477–4480.
- Buajeeb, W., Poomsawat, S., Punyasingh, J., & Sanguansin, S. (2009). Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 38(1), 104–108. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00710.x>
- Castagnola, M., Picciotti, P. M., Messana, I., Fanali, C., Fiorita, a, Cabras, T., ... Scarano, E. (2011). Potential applications of human saliva as diagnostic fluid. *Acta Otorhinolaryngologica Italica : Organo Ufficiale Della Società Italiana Di Otorinolaringologia E Chirurgia Cervico-Facciale*, 31(6), 347–57. <https://doi.org/unknown>
- David Elashoff, Hui Zhou, Jean Reiss³, Jianghua Wang, Bradley Henson, S., Hu, Martha Arellano, Uttam Sinha⁶, Anh Le⁷, Diana Messadi, Marilene Wang, V., Nabili, Mark Lingen, Darly Morris, Timothy Randolph, Ziding Feng, D. A., & Dragana A. Kastratovic, David Chia,⁺ Elliot Abemayo, and D. T. W. (2012). Pre- Validation of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 664–672.
- Don, K. R., Ramani, P., Ramshankar, V., Sherlin, H. J., Premkumar, P., & Natesan, A. (2014). Promoter hypermethylation patterns of P16, DAPK and MGMT in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 25(6), 797–805. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.152208>
- Fallis, A. . (2013). Aprender Sobre o Câncer. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Fitzpatrick, S. G., Montague, L. J., Cohen, D. M., & Bhattacharyya, I. (2013). CD44 Expression in Intraoral Salivary Ductal Papillomas and Oral Papillary Squamous Cell Carcinoma. *Head and Neck Pathology*, 7(2), 122–128. <https://doi.org/10.1007/s12105-012-0407-y>

- Franzmann, Elizabeth J., Erika P. Reategui, Lutecia H. Mateus Pereira, Felipe Pedroso, Debbie Joseph, Glenn O. Allen, Kara Hamilton, Isildinha Reis, Robert Duncan, W. J. G., & Jennifer J. Hu, and V. B. L. (2013). Salivary Protein and SolCD44 Levels as a Potential Screening Tool for Early Detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, 34(5), 687–695. <https://doi.org/10.1002/hed.21810>. Salivary
- Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). *Cancer biomarkers. Molecular Oncology*, 6(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
- Jayaprakash, C., Radhakrishnan, R., Ray, S., & Satyamoorthy, K. (2017). Promoter methylation of MGMT in oral carcinoma: A population-based study and meta-analysis. *Archives of Oral Biology*, 80, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.006>
- Jiang, W., Masayesva, B., Zahurak, M., Carvalho, A. L., Rosenbaum, E., Mambo, E., ... Califano, J. (2005). Human Cancer Biology Increased Mitochondrial DNA Content in Saliva Associated with Head and Neck Cancer, 11(7), 2486–2492.
- Jithesh, P. V, Risk, J. M., Schache, A. G, Dhanda, J., Lane, B., Liloglou, T., & Shaw, R. J. (2013). The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer*, 108(2), 370–379. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.568>
- Kaur, J., & Jacobs, R. (2015). Proinflammatory cytokine levels in oral lichen planus, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 41(4), 171–5. <https://doi.org/10.5125/jkaoms.2015.41.4.171>
- Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 5(10), 588–99. <https://doi.org/10.1038/ncponc1187>
- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. *American Journal of Dentistry*, 22(4), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.05.010>

- Li, Y., John, M. A. R. S., Zhou, X., Kim, Y., Sinha, U., Jordan, R. C. K., ... Wong, D. T. (2004). Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection Salivary Transcriptome Diagnostics for Oral Cancer Detection. *Clin Cancer Res*, 10(310), 8442–8450. <https://doi.org/10.24/8442> [pii]r10.1158/1078-0432.CCR-04-1167
- Liao PH, Chang YC, Huang MF, Tai KW, C. M. (2000). Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, 36(3), 272–276.
- Liggett, W. H., & Sidransky, D. (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 16(3), 1197–1206. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.3.1197>
- Lin, Y., Hupp, T. R., & Stevens, C. (2010). Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: Additional roles beyond cell death. *FEBS Journal*, 277(1), 48– 57. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07411.x>
- Makiko S. FLiss, Henning Usadel, Otavia L. aballero, Li WU, Martin R. Buta, Scott M. Elefff Jin Jen, 'David Sidranskyl. (2000). Facile Detection of Mitochondrial DNA mutations in Tumor and Bodily Fluids, 287(March), 1997–1999.
- Malamud, Daniel and Rodriguez-Chavez, I. R. (2011). Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am*, 159–178.
- Malathi, N., Mythili, S., & Vasanthi, H. R. (2014). Salivary diagnostics: a brief review. *ISRN Dentistry*, 2014, 158786. <https://doi.org/10.1155/2014/158786>
- Markopoulos, A. K., Michailidou, E. Z., & Tzimagiorgis, G. (2010). Salivary markers for oral cancer detection. *The Open Dentistry Journal*, 4, 172–8. <https://doi.org/10.2174/1874210601004010172>
- Mehta, S., Shelling, A., Muthukaruppan, A., Lasham, A., Blenkiron, C., Laking, G., & Print, C. (2010). Predictive and prognostic molecular markers for cancer medicine. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 2(2), 125–148. <https://doi.org/10.1177/1758834009360519>
- Michailidou, E., Tzimagiorgis, G., Chatzopoulou, F., Vahtsevanos, K., Antoniadis, K., Kouidou, S., ... Antoniadis, D. (2016). Salivary mRNA markers having the potential to detect oral squamous cell carcinoma segregated from oral leukoplakia with dysplasia. *Cancer Epidemiology*, 43, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.04.011>

- Miller, C. S., Foley, J. D., Bailey, A. L., Campell, C. L., Humphries, R. L., Christodoulides, N., ... McDevitt, J. T. (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomarkers in Medicine*, 4(1), 171–189. <https://doi.org/10.2217/bmm.09.68>
- Miranda, N., Portugal, C., Nogueira, P. J., Farinha, C. S., Oliveira, A. L., Soares, A. P., Serra, L. (2016). Doenças Oncológicas em Números – 2015. *Direção-Geral Da Saúde* (DGS), 1–66. <https://doi.org/ISSN: 2183-0746>
- Nagler, R., Bahar, G., Shpitzer, T., & Feinmesser, R. (2006). Concomitant analysis of salivary tumor markers - A new diagnostic tool for oral cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(13), 3979–3984. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2412>
- Nowsheen, S., Aziz, K., Panayiotidis, M. I., & Georgakilas, A. G. (2012). Molecular markers for cancer prognosis and treatment: Have we struck gold? *Cancer Letters*, 327(1–2), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.11.022>
- Panneer Selvam, N., & Sadaksharam, J. (2015). Salivary interleukin-6 in the detection of oral cancer and precancer. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 11(3), 236–241. <https://doi.org/10.1111/ajco.12330>
- Prasad, G., & McCullough, M. (2013). Chemokines and cytokines as salivary biomarkers for the early diagnosis of oral Cancer. *International Journal of Dentistry*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/813756>
- Punyani, S. R., & Sathawane, R. S. (2013). Salivary level of interleukin-8 in oral precancer and oral squamous cell carcinoma. *Clinical Oral Investigations*, 17(2), 517–524. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0723-3>
- Radhika, T., Jeddy, N., Nithya, S., & Muthumeenakshi, R. M. (2016). Salivary biomarkers in oral squamous cell carcinoma – An insight. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6, S51–S54. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2016.07.003>
- Ramnarayan Belur Krishna Prasad, Akhilesh Sharma, and H. M. B. (2013). An insight into salivary markers in oral cancer. *Dental Research Journal*.

- Rosas, S. L. B., Koch, W., da Gloria da Costa Carvalho, M., Wu, L., Califano, J. A., Westra, W. H., ... Sidransky, D. (2001). Promoter Hypermethylation Patterns of p16, O6 -Methylguanine-DNA-methyltransferase, and Death-associated Protein Kinase in tumors and Saliva of Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Research*, 61, 939–942.
- Sahibzada HA, Khurshid Z, Khan RS, Naseem M, Siddique KM, Mali M, Z. M. (2017). Salivary IL-8, IL-6 and TNF- α as Potential Diagnostic Biomarkers for Oral Cancer. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute* (MDPI).
- Saluja, T. S., Spadigam, A., Dhupar, A., & Syed, S. (2016). Equating salivary lactate dehydrogenase (LDH) with LDH-5 expression in patients with oral squamous cell carcinoma: An insight into metabolic reprogramming of cancer cell as a predictor of aggressive phenotype. *Tumor Biology*, 37(4), 5609–5620. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4415-x>
- Sannam Khan, R., Khurshid, Z., Akhbar, S., & Faraz Moin, S. (2016). Advances of Salivary Proteomics in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Detection: An Update. *Proteomes*, 4(4), 41. <https://doi.org/10.3390/proteomes4040041>
- Santos, P. P. D. A., Iglesias, D. P. P., Souza, E. L. De, Freitas, R. D. A., & Galvão, H. C. (2007). Saliva: Métodos Atuais para Coleta e Obtenção da Amostra. *R. Fac. Odontol Porto Alegre*, 48(1/3), 95–98.
- Saxena, S., Sankhla, B., Sundaragiri, K., & Bhargava, A. (2017). A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis. *Advanced Biomedical Research*, 6(1), 90. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.211801>
- Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5(March). <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>
- Shpitzer, T., Hamzany, Y., Bahar, G., Feinmesser, R., Savulescu, D., Borovoi, I., ... Nagler, R. M. (2009). Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *British Journal of Cancer*, 101(7), 1194–1198. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605290>
- Vielba, R., Bilbao, J., Ispizua, A., Zabalza, I., Alfaro, J., Rezola, R., ... de la Hoz, C. (2003). p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *The Laryngoscope*, 113(1), 167–172. <https://doi.org/10.1097/00005537-200301000-00031>

- Virginia, C. C. M., & Piper, G. (2017). Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nature Publishing Group*.
<https://doi.org/10.1038/nrc.2017.69>
- Wang, A., Wang, C., Tu, M., & Wong, D. (2016). Oral Biofluid Biomarker Research: Current Status and Emerging Frontiers. *Diagnostics*, 6(4), 45.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics6040045>
- Warnakulasuriya, S., Soussi, T., Maher, R., Johnson, N., & Tavassoli, M. (2000). Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients. *Journal of Pathology*, 192(1), 52–57. [https://doi.org/10.1002/1096-9896\(2000\)9999:9999::AID-PATH669>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH669>3.0.CO;2-C)
- Winter, J., Pantelis, A., Reich, R., Martini, M., Kraus, D., Jepsen, S., ... Wenghoefer, M. (2011). Human beta-defensin-1, -2, and -3 exhibit opposite effects on oral squamous cell carcinoma cell proliferation. *Cancer Investigation*, 29(3), 196–201. <https://doi.org/10.3109/07357907.2010.543210>
- Wongnoppavich, A., Dukaew, N., Choonate, S., & Chairatvit, K. (2017). Upregulation of maspin expression in human cervical carcinoma cells by transforming growth factor β 1 through the convergence of Smad and non-Smad signaling pathways. *Oncology Letters*, 3646–3652. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.5939>
- Yakob, M., Fuentes, L., Wang, M. B., Abemayor, E., & Wong, D. T. W. (2014). Salivary biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma-current state and recent advances. *Current Oral Health Reports*, 1(2), 133–141. <https://doi.org/10.1007/s40496-014-0014-y>
- Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T.W. (2013). Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 781–791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>
- Zhong, L. ping, Zhang, C. ping, Zheng, J. wei, Li, J., Chen, W. tao, & Zhang, Z. yuan. (2007). Increased Cyfra 21-1 concentration in saliva from primary oral squamous cell carcinoma patients. *Archives of Oral Biology*, 52(11), 1079–1087. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.05.005>

Zimmerman, Bernhard G. and Wong, D. T. (2013). Salivary mRNA targets for cancer diagnostics, 70(4), 646–656. <https://doi.org/10.1002/ana.22528>. Toll-like